Schuster, L. 1949. *Beobachtungen über Aufsuchen und Verlassen des Schlafplatzes beim Mäusebussard (B. buteo), nebst einigen allgemeinen Bemerkungen über das Zurruhegehen der Vögel.* Ornithologie als biologische Wissenschaft (Festschrift Stresemann).

Nº 23. **W. Geiger,** Bern. — Elektronenoptische Untersuchungen am Salmonidensperma [1].

Mit 4 Textabbildungen.

(Aus dem Zoologischen Institut der Universität Bern.)

Einleitung

Obwohl schon verschiedene Arbeiten über den Feinbau des plasmatischen Anteils des Salmonidenspermiums erschienen sind, ist bis heute die Frage nach dem Äquivalenzgrad dieser Befunde noch offen geblieben.

Im Spermaliquor sind die Samenzellen der Salmoniden noch unbeweglich. Erst beim Laichakt, wenn sie ins Wasser gelangen, machen sie eine kurzfristige Bewegungsphase durch. Roetheli und Roth (1950) fanden an Forellen- und Felchensperma, das während seiner Bewegungsphase aus Seewasser, dem natürlichen Laichmilieu, fixiert worden war, im Elektronenmikroskop sogenannte „Kinoplasmabläschen". Die Autoren nahmen an, dass diese in regelmässigen Abständen auf der Längsachse des Spermaschwanzes verteilten blasigen Anschwellungen des Zytoplasmas in funktionellem Zusammenhang mit der Bewegung der Spermien stünden.

Diesem Befund stehen Beobachtungen mittelst Phasenkontrastmikroskop über das Verhalten von Salmonidenspermien in isoto-

[1] Ausgeführt mit Unterstützung der Eidg. Kommission zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung aus Arbeitsbeschaffungsmitteln des Bundes.

nischen und hypotonischen Medien gegenüber (Fischer, Hug und Lippert 1952; Hug, Lippert und Fischer 1953), wonach die Kinoplasmabläschen Produkte osmotischer Schwellung und beginnender „Plasmolyse" wären. Andere, von Roetheli und Roth *(l. c.)* und Roetheli, Roth und Medem (1950) innerhalb der Plasmahülle festgestellte fadenförmige, plasmatische Strukturen mit undeutlicher Querstreifung werden von Fischer, Hug und Lippert als „Antrocknungsränder" betrachtet. Lowman (1953) deutet die „Kinoplasmabläschen" ebenfalls als Artefakte, „weil Roetheli und Roth ihre Existenz nicht mit allen angewendeten Fixierungsmethoden nachweisen konnten".

Hug und Lippert (1951) halten die am Spermaschwanz der Salmoniden beobachteten, vermutlich auf osmotischer Schwellung beruhenden Vorgänge für vergleichbar mit Schwellungserscheinungen anderer tierischer Zellen (z. B. Blutzellen) und Zellbestandteilen (z. B. Mitochondrien) im hypotonischen Milieu. In der Tat weisen die von Weber (1954) als „blisters" beschriebenen, an der Oberfläche von Mitochondriengranula befindlichen Bläschen auffallend starke Ähnlichkeit mit den „Kinoplasmabläschen" am Spermienschwanz auf.

Die an den Befunden von Roetheli und Roth geübte Kritik veranlasste uns, die Resultate zu überprüfen und zu versuchen, durch Anwendung verschiedenartiger Behandlungs- und Fixierungsmethoden zum bessern Verständnis der Feinstruktur des Spermienschwanzes und im besonderen seiner plasmatischen Hülle beizutragen.

Material und Methoden.

Zur Untersuchung wurde reifes Sperma der Bachforelle *(Salmo fario L.)* aus dem Glütschbach (Berner Oberland) und der Bondelle (*Coregonus* sp.), eines Felchens aus dem Bielersee verwendet. Die Tiere wurden lebendfrisch in den Monaten Dezember und Januar 1954/55 in den staatlichen Fischzuchtanstalten Faulensee und Ligerz gestreift [1] und das Sperma wenige Stunden nach der Gewinnung verarbeitet (Aufbewahrungstemperatur zwischen 1° und 6° C). Die Fixierung erfolgte entweder direkt oder nach kurzer

[1] Ich möchte an dieser Stelle Herrn Dr. H. Roth, Fischereiadjunkt der Forstdirektion des Kantons Bern, der uns in freundlicher Weise das Untersuchungsmaterial verschafft hat, herzlich danken.

Vorbehandlung mit hypotonischen oder isotonischen Lösungen vor Ende des Ablaufs der Bewegungsphase. Fixiert wurde während 10 Minuten im Vibrator, mit nachfolgendem Auswaschen in a.dest. durch mehrmaliges Zentrifugieren der Suspension, worauf ein kleiner Tropfen der sehr verdünnten Suspension auf der Formvar-Trägerfolie aufgetrocknet wurde. Als Vorbehandlungsmedien wurden verwendet: 1. a.dest., 2. Bielersee- resp. Thunerseewasser, 3. Komplexon III 10^{-3} m, 4. Isotonische Kochsalzlösung 0.13 m, 5. Isotonische Mannitlösung 0.24 m, 6. Isotonische Saccharoselösung 0.29 m, 7. Glycerin konz. resp. 50%, 8. Fruchtwasser der entsprechenden Fischart. Als Fixierungsmittel dienten: 1. Formalin 4% resp. 8%, 2. Osmiumtetroxyd 2% und Phosphatpuffer 1:1, und Osmiumtetroxyd 2% und Veronalacetatpuffer 1:1 nach Palade 1952, 3. das Gemisch von Regaud (K-bichromat, Formol), 4. Regaud sauer (K-bichromat, Formol, Eisessig), 5. Bouin (Pikrinsäure, Formol, Eisessig), 6. Rabl (Pikrinsäure, Sublimat). Von den Gemischen nach Regaud und Bouin wurden verschiedene Konzentrationsstufen verwendet (100%, 50% und 25%), wobei jeweils das fertige Gemisch mit a.dest. verdünnt wurde. Zum Teil wurde unfixiertes Material direkt oder nach kurzer Vorbehandlung auf die Trägerfolien gebracht und im gekühlten Exsiccator unter Vakuum rasch getrocknet. Während des Präparationsgangs gelangte das Material nie in höhere Temperaturen als 12° C. Sein Verhalten wurde im Verlauf der Behandlung ständig im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Die Beschattung der fertigen Präparate erfolgte durch Schrägbedampfung (Beschattungswinkel $\operatorname{tg} \alpha = 1/4$) mit Goldmanganin. Die Bilder wurden mit dem Trüb-Täuber Elektronenmikroskop des Chemischen Instituts der Universität Bern (0.4 mA, 48 kV) aufgenommen.

Ergebnisse.

A. *Das Verhalten der Spermien in verschiedenen Medien (Beobachtung im Phasenkontrastmikroskop)*

1. Forellen- und Felchensperma in destilliertem Wasser, Thuner- resp. Bielerseewasser und Komplexon III 10^{-3} m:

Die verschiedenen Abschnitte der Bewegungsphase der Spermien sind im allgemeinen von normaler Dauer und laufen in der gleichen Folge ab, wie sie Medem, Roetheli und Roth (1949) beschrieben

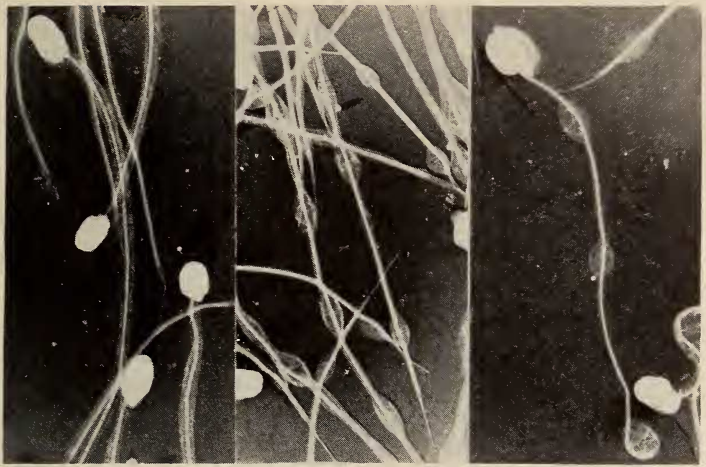
haben („vollaktiv, langsamer, freies Zittern, zittern an Ort, bewegungslos").

Zu Beginn sind die Schwänze scharf konturiert, dann erscheint zu beiden Seiten des Achsenfadens und um den Kopf ein dünner, gleichmässiger, grauer Saum. Bald darauf treten, mehr oder weniger regelmässig über die Länge des Schwanzes verteilt, als graue Schatten die ersten Bläschen auf. Häufig erscheint (ca. 2 Min. nach Zugabe des Wassers) an der Schwanzspitze eine umfangreichere Blase, die langsam, unter Aufrollung des Achsenfadens, gegen den Spermakern zuwandert und dabei die kleineren Bläschen in sich aufnimmt. Nach insgesamt ca. 4 Minuten hat die Blase den Kopf erreicht. In andern Fällen wandert nicht eine Blase von der Schwanzspitze gegen den Kern hin, sondern die verteilten kleinen lokalen Anschwellungen vergrössern und vereinigen sich mit benachbarten Blasen. Die anliegenden Abschnitte des Achsenfadens werden zu Schleifen gebogen, sodass schliesslich ebenfalls der ganze Achsenfaden um eine einzige grosse Blase gerollt dicht hinter dem Kopf und zuletzt in losen Windungen um den Kopf selber herumgelegt erscheint. Wird zuerst eine grössere Endblase gebildet, so kann man beobachten, dass bei der Spermabewegung Kopf und Endblase nur sehr schwach hin und her pendeln, während der zwischen beiden liegende freie Schwanzteil noch kräftig Bewegungen ausführt. Hat die Blase mit dem aufgerollten Achsenfaden das caudale Ende des Kopfes erreicht, so kommt es vor, dass der Kopf noch immer schwach hin und her pendelt. Bei längerem Zuwarten splittert der Achsenfaden in seine Fibrillen auf, das Zwischenstück beginnt zu quellen und sich vom Kopf abzulösen, und die Plasmablase zerfällt in verschiedene kleinere vom Achsenfaden des Schwanzes isolierte Bläschen.

Einzelne Phasen dieser Blasenbildung und Aufrollung des Achsenfadens wurden durch Fixierung mit gepuffertem Osmiumtetroxyd festgehalten und unter das Elektronenmikroskop gebracht (Abb. 1 *a*, *b*, *c*; Abb. 2 *a*, *b*, *c*).

2. Forellen- und Felchensperma in (isotonischer) Kochsalzlösung:

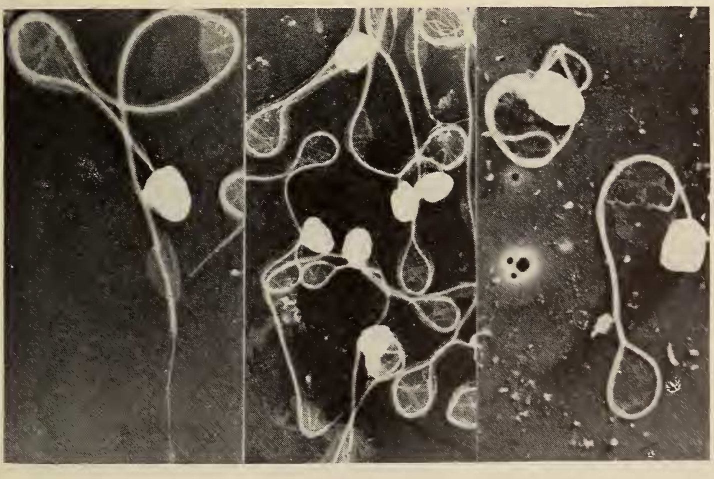
Auf „freies Zittern" folgt nicht „Zittern an Ort", sondern allmählich langsamer werdende undulierende Bewegung der Schwänze mit entsprechend langsamem Pendeln der Köpfe. Nur an ganz wenigen Schwänzen können vereinzelte lokale Anschwellungen



a b c

ABB. 1.

Sperma der Bachforelle. Fix. $0s0_4$ 1% gepuffert. Vorbehandlung A. dest. 2 000 ×.
a: Plasmasaum. — *b*: ,,Kinoplasmabläschen". — *c*: Endblase. Beginnende Einrollung des Achsenfadens.



a b c

ABB. 2.

(Fortsetzung von Abb. 1.)
a: Fix. $0s0_4$ 1% gepuffert. 3 000 ×. Beginnende Schleifenbildung. — *b*: 2 000 ×. Schleifen des Achsenfadens. — *c*: Fix. Formol 4%. Aufwicklung des Achsenfadens. 3 000 ×.

beobachtet werden, die sich aber nicht verändern. Beim Eintrocknen der Salzlösung und der damit rasch ansteigenden Konzentration zerplatzen die Köpfe, wie nach der Beschreibung von Pollister und Mirsky (1946). Die Schwänze sind gestreckt.

3. Forellen- und Felchensperma in (isotonischer) Saccharoselösung:

Der Bewegungsablauf entspricht ungefähr demjenigen in der Kochsalzlösung. Lokale Anschwellungen der Plasmahülle waren im Lichtmikroskop nicht zu beobachten. Nach abgelaufener Bewegungsphase sind die Schwänze gestreckt.

4. Forellen- und Felchensperma in (isotonischer) Mannitlösung:

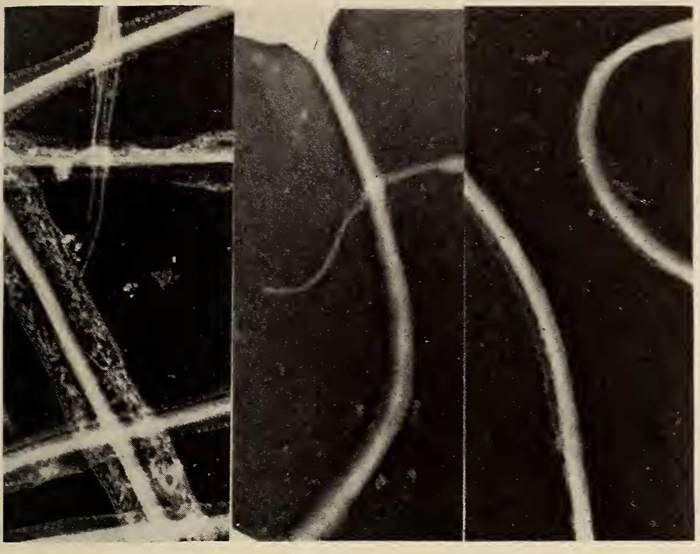
Nach ca. 1 Minute geht die langsamer werdende freie Bewegung in eine kurze Phase unkoordinierter Zuckungen der Schwänze über, worauf diese ausgestreckt still liegen, während die Köpfe sich noch langsam hin und her bewegen. Die Schwänze zeigten in äusserst seltenen Fällen schwache lokale Anschwellungen.

5. Forellen- und Felchensperma im arteigenen unverdünnten Fruchtwasser:

Der Bewegungsablauf ist normal. Lokale Anschwellungen der Plasmahülle sind nicht zu beobachten. Beim Eintrocknen des Mediums platzen die Köpfe in gleicher Weise wie in der Kochsalzlösung.

B. *Das Verhalten des Spermienschwanzes gegenüber verschiedenen Fixierstoffen und Fixierstoffgemischen.*

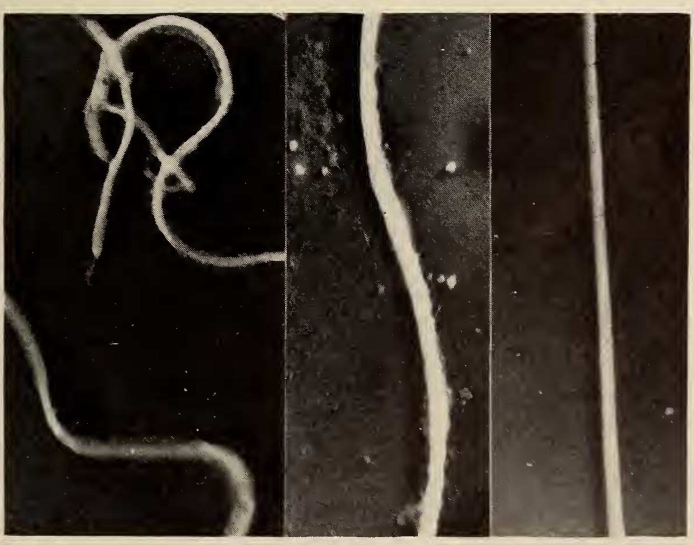
Beim Vergleich der elektronenmikroskopischen Bilder fällt der grosse Unterschied zwischen den mit Osmiumtetroxyd und den mit andern Stoffen fixierten Spermien auf. Nach Fixierung mit Osmiumtetroxyd (Abb. 3 *a*) erscheint, in Übereinstimmung mit den von den andern Autoren gezeigten Bildern, die Plasmahülle als breites, der Trägerfolie flach aufliegendes Band. Die Fibrillen des Achsenfadens sind meist unterscheidbar. Im Plasmasaum erscheinen häufig fadenförmige oder perlschnurartige, parallel zum Achsenfaden verlaufende Strukturen. Ob es sich dabei um „Antrocknungsartefakte" (Hug, Lippert und Fischer *l. c.*) oder um natürliche (kontraktile ?) Strukturelemente handelt (Roetheli und Roth *l. c.*), können wir nach dem jetzigen Stand unserer Untersuchungen nicht entscheiden.



a b c

ABB. 3.

Sperma der Bachforelle. 10 000 ×.
a: Fix. $0s0_4$ 1% gepuffert. — *b*: luftgetrocknet aus NaCl-Lösung 0,75%. — *c*: Fix. Regaud.



a b c

ABB. 4.

Sperma der Bachforelle 10 000 ×.
a: Fix. Regaud mit Zusatz von Eisessig. — *b*: Fix. Bouin und A. dest. 1:1. — *c*: Fix. Formol 4%.

Nach Fixierung mit stark fällenden Reagentien, wie Regaud (Abb. 3 *c*), Regaud mit Zusatz von Essigsäure (Abb. 4 *a*), Bouin (Abb. 4 *b*) und Rabl ist der Plasmasaum bedeutend schmäler und kompakter und für Elektronen nur schwach durchlässig. Die mit diesen vier Gemischen erhaltenen Bilder unterscheiden sich kaum voneinander. Sie unterscheiden sich auch nicht vom Bild, welches das mit unverdünntem Spermaliquor auf die Trägerfolie gebrachte, luftgetrocknete Sperma liefert (Abb. 3 *b*). Nach Formolfixierung erscheint der Schwanz als dünner zylindrischer Körper von kreisrundem Querschnitt (Abb. 4 *c*).

Diskussion der Ergebnisse.

Die überlebenden Spermien zeigen in den geprüften Medien unterschiedliches Verhalten. Kurz nach dem Einbringen in Seewasser, das biologisch normale Milieu der Spermienaktivität, vollzieht sich eine rasch fortschreitende Schwellung der Plasmahülle unter Blasenbildung und schliesslichem Zerfall des protoplasmatischen Anteils des Spermiums. Dieser Vorgang kann auch durch Anwesenheit von Komplexon III nicht aufgehalten oder verlangsamt werden. Der Prozess verläuft in Seewasser, a.dest. und Komplexon III 10^{-3} m in gleicher Weise und mit derselben Geschwindigkeit. Die dabei auftretenden Blasen, von Roetheli und Roth *(l.c.)* als „Kinoplasmabläschen" beschrieben, können aus folgenden Gründen nicht in funktionellen Zusammenhang mit der Bewegung des Spermaschwanzes gebracht werden:

1. Spermien, in (isotonische) Kochsalz-, Mannit- oder Saccharoselösung sowie Fruchtwasser gebracht, bewegen sich, trotz Fehlens der „Kinoplasmabläschen".

2. Noch unbewegliche, mit Spermaliquor ins Fixierungsmittel gebrachte Spermien weisen im Licht- und Elektronenmikroskop die gleichen Struktureigenschaften auf wie Spermien, die während oder nach abgelaufener Bewegungsphase aus Kochsalz-, Saccharose- oder Mannitlösung sowie Fruchtwasser heraus fixiert wurden.

Man darf deshalb wohl annehmen, dass die beschriebenen Bläschen Schwellungsprodukte sind und den Beginn des physiologischen Strukturzerfalls des Spermas nach dem Laichakt im biologisch

normalen Milieu darstellen. Ein wichtiger Punkt in der Beweisführung ist auch die Tatsache, dass mässige Schwellung des Plasmasaums bei Rückführung der Spermien in „physiologisches" Milieu reversibel ist (Hug, Lippert und Fischer *l.c.*).

Der breite Plasmasaum der mit Osmiumtetroxyd fixierten Spermien lässt darauf schliessen, dass dieses Fixierungsmittel nicht im Stande ist, die Schwellung und die beginnenden autolytischen Prozesse vollkommen zu verhindern. Dafür spricht auch das Vorhandensein von lokalen, bläschenförmigen Anschwellungen, die wir hie und da bei direkt aus Spermaliquor fixierten Spermien finden konnten. Sollten die nach Osmiumtetroxydfixierung innerhalb des Plasmasaums sichtbaren fadenförmigen oder perlschnurartigen Gebilde sich nicht als Artefakte erweisen, so wäre Osmiumtetroxyd, trotz seines erwähnten Nachteils, in dieser Hinsicht den andern Fixierungsmitteln vorzuziehen. Bei der Annahme eines kreisrunden Querschnittes des Spermaschwanzes der Salmoniden würden die Bilder formolfixierter Spermien dem nativen Zustand am nächsten kommen. Bemerkenswert ist die Ähnlichkeit in der Wirkungsweise von sauren Gemischen (Bouin, Regaud sauer und Rabl) und dem neutralen Regaud sowie der raschen Lufttrocknung.

Die von andern Autoren postulierten Spiralwindungen der Plasmahülle um den Achsenfaden herum können wir noch nicht darstellen. Nach Vorbehandlung mit hochprozentigem Glycerin und nachfolgender Lufttrocknung fanden wir allerdings im Elektronenmikroskop Strukturen, welche die Existenz einer spiralig gewundenen Plasmascheide, wie sie Lowman *(l. c.)* in leider nur sehr undeutlichen Bildern zeigt, wenigstens vermuten lassen.

Trotz der Anwendung verschiedener Fixierungsmittel, ist es uns bis jetzt noch nicht gelungen, weder in der Plasmahülle noch in den Fibrillen, mit Sicherheit spezifische Strukturen nachzuweisen, die funktionell als Träger der Bewegung des Salmonidenspermiums interpretiert werden könnten.

LITERATUR

Fischer, H., Hug, O. und W. Lippert. 1952. *Elektronenmikroskopische Studien an Forellenspermatozoen und ihren Zellkernen.* Chromosoma 5: 69-80.

Hug, O. und W. Lippert. 1951. *Grenzschichten animalischer Zellen im Elektronenmikroskop.* Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 213: 395-401.

— Lippert, W. und H. Fischer. 1953. *Das elektronenoptische Bild der Salmonidenspermatozoen.* Protoplasma 42: 94-99.

Lowman, F. G. 1953. *Electron Microscope Studies of Silver Salmon Spermatozoa (Oncorhynchus kisutch Walbaum).* Exp. Cell Research 5: 335-360.

Medem, F., Roetheli, A. und H. Roth. 1949. *Biologischer Nachweis von Befruchtungsstoffen bei Felchen und Flussforelle.* Schweiz. Z. Hydrol. 11: 361-377.

Palade, G. E. 1952. *A study of fixation for electron microscopy.* J. exper. Med. 95: 285-298.

Pollister, A. W. und A. E. Mirsky. 1946. *The Nucleoprotamine of Trout Sperm.* J. gen. Physiol. 30: 101-116.

Roetheli, A. und H. Roth. 1950. *Elektronenoptische Untersuchungen an Salmonidenspermien.* Rev. suisse Zool. 57: 503-510.

— Roth, H. und F. Medem. 1950. *Elektronenoptische Untersuchungen der Strukturveränderungen agglutinierter Fischspermien.* Exp. Cell Research 1: 115-126.

Weber, R. 1954. *Strukturveränderungen an isolierten Mitochondrien von Xenopus-Leber.* Z. Zellf. 39: 630-640.

N° 24. **O. Puchta** und **J. Seiler,*** Zürich. — Die Entwicklung des Genitalapparates bei triploiden Intersexen von *Solenobia triquetrella* (Lepid. Psychidae).

Es sollen hier nur die wesentlichen Ergebnisse unserer Untersuchung kurz referiert werden.

1. Seiler zeigte in seiner zusammenfassenden Darstellung in der „Experientia" (1949), dass das Goldschmidt'sche Zeitgesetz der Intersexualität weder auf die triploiden noch auf die diploiden intersexen Solenobien anwendbar ist. Gleichzeitig wurde ein neuer

* In Dankbarkeit sei festgestellt, dass die Durchführnng dieser Arbeit durch ein Stipendium aus dem Nationalfonds ermöglicht wurde.